



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0028807  
Application Number

출 원 년 월 일 : 2003년 05월 07일  
Date of Application MAY 07, 2003

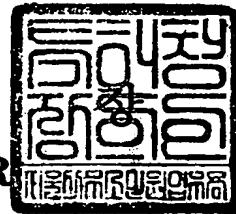
출 원 인 : 선바이오(주)  
Applicant(s) SUNBIO INC.



2003 년 07 월 08 일

특 허 청

COMMISSIONER





1020030028807

출력 일자: 2003/7/9

## 【서지사항】

|            |                                                           |
|------------|-----------------------------------------------------------|
| 【서류명】      | 특허출원서                                                     |
| 【권리구분】     | 특허                                                        |
| 【수신처】      | 특허청장                                                      |
| 【제출일자】     | 2003.05.07                                                |
| 【발명의 명칭】   | 신규한 폴리에틸렌글리콜-말레이이미드 유도체의 합성방법                             |
| 【발명의 영문명칭】 | Novel Preparation method of PEG-maleimide PEG derivatives |
| 【출원인】      |                                                           |
| 【명칭】       | 선바이오 (주)                                                  |
| 【출원인코드】    | 1-1998-704061-1                                           |
| 【대리인】      |                                                           |
| 【성명】       | 신동인                                                       |
| 【대리인코드】    | 9-2000-000156-1                                           |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-076849-2                                             |
| 【발명자】      |                                                           |
| 【성명의 국문표기】 | 노광                                                        |
| 【성명의 영문표기】 | NHO,Kwang                                                 |
| 【주민등록번호】   | 571031-1000410                                            |
| 【우편번호】     | 110-054                                                   |
| 【주소】       | 서울특별시 종로구 사직동 181-3                                       |
| 【국적】       | KR                                                        |
| 【발명자】      |                                                           |
| 【성명의 국문표기】 | 현창민                                                       |
| 【성명의 영문표기】 | HYUN,Chang Min                                            |
| 【주민등록번호】   | 710105-1932215                                            |
| 【우편번호】     | 156-030                                                   |
| 【주소】       | 서울특별시 동작구 상도동 108-9 201호                                  |
| 【국적】       | KR                                                        |
| 【발명자】      |                                                           |
| 【성명의 국문표기】 | 이정훈                                                       |
| 【성명의 영문표기】 | LEE,Jung Hun                                              |
| 【주민등록번호】   | 741115-2235615                                            |



1020030028807

출력 일자: 2003/7/9

|            |                                                                   |
|------------|-------------------------------------------------------------------|
| 【우편번호】     | 411-530                                                           |
| 【주소】       | 경기도 고양시 일산구 사리현동 23-87                                            |
| 【국적】       | KR                                                                |
| 【발명자】      |                                                                   |
| 【성명의 국문표기】 | 박영경                                                               |
| 【성명의 영문표기】 | PAK, Young Kyoung                                                 |
| 【주민등록번호】   | 761020-2047311                                                    |
| 【우편번호】     | 156-844                                                           |
| 【주소】       | 서울특별시 동작구 상도3동 315-23                                             |
| 【국적】       | KR                                                                |
| 【심사청구】     | 청구                                                                |
| 【취지】       | 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인<br>신동인 (인) |
| 【수수료】      |                                                                   |
| 【기본출원료】    | 20 면 29,000 원                                                     |
| 【가산출원료】    | 15 면 15,000 원                                                     |
| 【우선권주장료】   | 0 건 0 원                                                           |
| 【심사청구료】    | 10 항 429,000 원                                                    |
| 【합계】       | 473,000 원                                                         |
| 【감면사유】     | 소기업 (70%감면)                                                       |
| 【감면후 수수료】  | 141,900 원                                                         |
| 【첨부서류】     | 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류_1<br>통                         |



1020030028807

출력 일자: 2003/7/9

### 【요약서】

#### 【요약】

본 발명은 신규한 PEG-말레이미드(PEG-maleimide) 유도체의 합성방법에 관한 것으로, 이들은 생체에 적합하고 생체친화성이 높은 고분자로서 다당류, 단백질, 항체 등의 생명공학 제품이나 화학의약품 등의 특정 부위나 도메인에 선택적으로 결합하여 생명공학, 의약학 분야의 새로운 의약품 또는 의료기기 등의 제제로 유용하게 사용될 수 있다.

#### 【색인어】

PEG-말레이미드 유도체, 생체 친화성, 의약품



1020030028807

출력 일자: 2003/7/9

## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

신규한 폴리에틸렌글리콜-말레이미드 유도체의 합성방법 {Novel Preparation method of PEG-maleimide PEG derivatives}

### 【발명의 상세한 설명】

### 【발명의 목적】

### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <1> 본 발명은 PEG-말레이미드(PEG-maleimide) 유도체의 합성방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 항체, 단백질, 효소 등의 생명공학 제품과 화학의약품 등 의약학 제제에 응용될 수 있는 PEG-말레이미드의 새로운 합성방법에 관한 것이다.
- <2> 일반적으로 유기용매 및 물에 잘 녹는 양친매성 고분자인 PEG (polyethylene glycol)는 폴리에틸렌 옥사이드(PEO)로도 잘 알려져 있으며, 이로 인해 수용성이 극히 낮은 물질이라도 PEG와 결합하면 수용성을 띠게 된다. 또한, PEG는 인체 내 면역 반응성이 거의 없고 무독성이라는 장점이 있어, 분자나 표면에 대한 화학적 결합은 생명 공학적으로 매우 유용하며, 결과적으로 인체 내 주사제등으로 널리 사용되고 있는 실정이다. PEG의 가장 일반적인 형태는 양쪽 끝부분에 하이드록실(hydroxyl)기를 갖는 선형 고분자로서, 그 구조식은 HO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH로 표현되며 간단히 HO-PEG-OH로 나타낼 수 있는데, 여기서 -PEG-는 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)로써, 말단의 반응기가 없는 폴리머 골격을 의미한다.

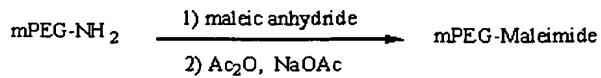
- <3> 또 다른 형태의 PEG로는 메톡시기를 한쪽 말단에 포함하고 나머지 한쪽 말단에는 하이드록시기를 갖는 메톡시폴리에틸렌 글리콜(methoxy-PEG-OH(이하 mPEG이라 함))가 일반적으로 사용되고 있다. 그 구조식은  $\text{CH}_3\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ 로 표현된다.
- <4> 일반적으로 PEG는 유기용매 및 물에 잘 녹으며 따라서 수용성이 극히 낮은 물질이라도 PEG와 결합하면 뛰어난 수용성을 보이며 결과적으로 인체내 주사제로서 적합한 성질을 가지게 된다. 그 예로서는 PEG-탁솔(PEG-taxol)이 있으며, 난소암 또는 유방암의 치료제로 쓰이는 탁솔은 그 자체로서는 수용성이 극히 낮아 그에 수반한 독성 및 주사 시에 오랜 시간이 걸린다는 점등의 어려움을 PEG와 결합시켜 해소케 하는데, PEG-탁솔은 탁솔에 비하여 수용성이 1000배 이상 높아져 문제점을 해결할 수 있다 (미국특허공개 제5,977,163호 및 제5,648,506호).
- <5> 단백질에 대한 PEG의 결합은 또한 면역거부 반응성을 줄이고 신장여과속도를 줄이는 등 인체 및 장기에 대한 독성을 낮출 수 있게 한다. 또한 PEG 부착으로 인한 전체 분자량의 증가는 혈류 내 잔존시간의 상당한 증가를 보인다. PEG와 결합된 물질은 세포에 의한 흡수를 줄이고 표면의 전기적 성질을 변화시킬 수 있으므로 약물 체내 배달체로서의 특수한 기능을 발휘할 수 있다. 이러한 장점을 바탕으로 일부 PEG 활성 유도체는 다양한 단백질이나 효소와 단백질이나 효소와 결합하여 유용한 의약품으로서 이용되어 왔다(J. Milton; *H. Poly ethylene glycol Chemistry.*, 1992).
- <6> 그러한 생명공학적 적용의 예로, PEG와 아데노신 디아미네이즈(adenosine deaminase, ADA)가 결합하여 이루어진 폴리에틸렌글리콜-아데노신디아미네이즈(PEG-ADA)는 아동 선천성 면역결핍증 치료제로서 사용되고 있으며, 또한 PEG와 아스파라

기나아제(asparaginase, ASP)가 결합한 폴리에틸렌글리콜-아스파라기나아제 (PEG-ASP)는 아동·백혈병 치료제로서 사용되고 있다. 그 밖에도 PEG-인터페론(PEG-interferon), PEG-GCSF 등이 항바이러스 제제 및 백혈구 증강인자로서 승인되어 사용되고 있다.

<7> 여러 의약학 제제와의 결합을 위하여 다양한 PEG 유도체 개발이 이루어지면서 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 메톡시폴리에틸렌 글리콜(mPEG)의 말단에 아민, N-하이드록시숙신이미딜 에스터(N-hydroxy succinimidyl ester) 등의 몇몇 유도체화 된 시약들의 합성이 이미 보고되었으며(미국특허 제4,179,337호; *J. Biol. Chem.*, 252, p3578, 1977; *Anal. Biochem.*, 131, p25, 1983; *Macromol. Chem.*, 182, p1397, 1981; *Eur. Polym. J.*, 19, p1177, 1983; *Synth. Commun.*, 20, p2951, 1990), 이들은 대부분 단백질의 라이신 가지나 아미노 말단에 직접 연결되는 시약으로 사용하였다. 이러한 접근은 몇몇 단백질의 경우에 성공적으로 응용되었으나 PEG의 결합이 단백질의 아미노 잔기에 무작위적으로 부착되어 그 결과로서 생리활성도가 현저히 떨어지는 등의 단점을 가지고 있었다 (Abuchowski, A, et al.; "Enzymes as drugs" p367-383, 1981; *J. Appl. Biochem.*, 5, p337, 1983.).

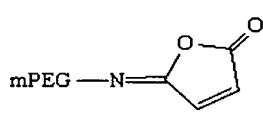
<8> 이러한 단점을 극복하고자 생물학적 단백질의 특정 도메인에 선택적으로 PEG를 결합시키거나 단백질 중 시스테인(cysteine)의 셀프하이드릴(sulfhydryl) 기에 mPEG(methoxy polyethylene glycol)을 접합시킬 수 있는 기술로 새로운 말레이미딜기를 유도체로 하는 PEG 유도체의 합성법이 개발되었다(*Bio/Technology*, 8, p343, 1990; *Chemistry of Peptides and proteins 2*, p29, 1984; *Synthetic Comm.*, 22(16), p2417, 1992.).

&lt;9&gt;

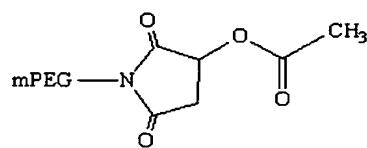


<10> 그러나 위의 보고에 따른 방법은 PEG 유도체의 합성과정에서 여러가지 문제점이 있는 것으로 확인되었다. 주 반응으로 생성되어야 하는 말레이미딜(maleimidyl)기 유도체 외에 온도와 염기촉매의 조건에 따라 다양한 부생성물이 발생한다. 온도가 낮을 경우 동역학적 중간체로써 이소이미드(isoimide) 기를 유도체로 하는 부가물(A)이 생성이 되며, 염기촉매의 양이 과다할 경우 이미 형성된 말레이미딜기에 마이클 부가물(B)이 일어난다. 또한 온도가 너무 높을 경우 아세트아닐리드(acetanilide) 기를 유도체로 하는 부생성물(C)이 발생한다.

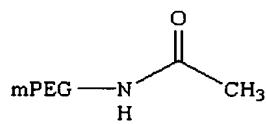
&lt;11&gt;



A. mPEG-Isoimide



B. Michael adduct



C. mPEG-Acetanilide

<12> 이와 같이 기존 문헌의 방법은 수율이 매우 낮고, 또한 고분자인 PEG가 고형화 된 후에도 불순물을 다수 포함하는 등 순도가 낮은 PEG-말레이미드 유도체가 합성된다. PEG의 특성상 분자량이 커지는 경우, 최종물질과 중간생성물과의 분리가 용이치 않고, 정제 과정에서 고가의 충진제를 사용한 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)가 필요하게 되는 등 기존 문헌에 따른 방법으로 합성할 경우 경제적이지 못하다(*J. Mat. Sci.*, C37, p61, 1997; *J. Org. Chem.*, 34(8), p2275, 1969; *Ger. Offen.*, 2, pp751-901, 1978; *Ger. Offen.*, 2, pp837-919, 1979).

<13> 본 발명에서는 종래의 PEG-말레이미드 유도체를 합성하는 방법이 갖는 매우 낮은 순도의 물질을 저수율로 합성하는 단점을 극복하고, 동시에 순도와 수율을 획기적으로

높인 새로운 합성법을 개발하기 위하여, 설프하이드릴기(sulphydryl group)를 가진 생체활성물질에 선택적으로 반응하는 PEG-말레이미드 유도체를 합성하여 본 발명을 완성하였다.

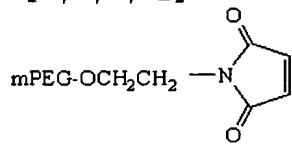
#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<14> 본 발명에서는 종래의 PEG-말레이미드 유도체를 합성하는 방법이 가진 매우 낮은 순도의 물질을 저수율로 합성하는 단점을 극복하고, 설프하이드릴기 (sulphydryl group)를 가진 생체활성물질에 선택적으로 반응하는 PEG-말레이미드 유도체를 합성하는데 있어서 순도와 수율을 획기적으로 높인 새로운 합성법을 개발하는데 그 목적이 있다. 자세하게는 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 (pentafluorophenyl trifluoroacetate)라는 새로운 염기촉매 하에서 고리화 반응에 의한 PEG-말레이미드 유도체를 합성하는데 그 목적이 있다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

<15> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생체적합성 고분자인 일반식 (I)의 mPEG-말레이미드(maleimide) 중합체 화합물을 제조하는 방법에 있어서, 일반식 (I-a)의 mPEG-말레이미드(maleamic acid) 유도체에 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트와 같은 반응화제를 염기 및 유기용매 존재 하에 반응시킴으로서 시클릭화를 시켜 일반식 (I) 중합체 화합물을 제조함을 특징으로 하는 제조방법을 제공한다.

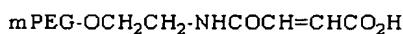
<16> 【화학식 1】



<17>

( I )

<18> [화학식 2]

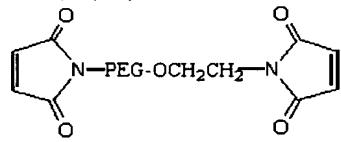


<19>

(I-a)

<20> 또한 본 발명은 일반식 (II)의 PEG-(말레이미드)<sub>2</sub> 중합체 화합물을 제조하는 방법에 있어서, 일반식 (II-a)의 PEG-비스(말례아믹 산)<sub>2</sub>에 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트와 같은 반응화제를 염기 및 유기용매 존재 하에 반응시킴으로서 시클릭화를 시켜 일반식 (II) 중합체 화합물을 제조함을 특징으로 하는 제조방법을 제공한다.

<21> 【화학식 3】



<22>

(II)

<23> 【화학식 4】

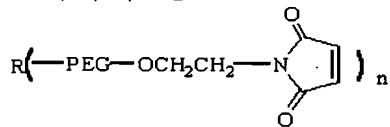


<24>

(II-a)

<25> 또한 본 발명은 일반식 (III)의 다중 암(arm) PEG-말레이미드 중합체 화합물을 제조하는 방법에 있어서, 일반식 (III-a)의 다중 암 PEG-말레아믹산에 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트와 같은 반응화제를 염기 및 유기용매 존재 하에 반응시킴으로서 시클릭화를 시켜 일반식 (III) 중합체 화합물을 제조함을 특징으로 하는 제조방법을 제공한다.

<26> 【화학식 5】

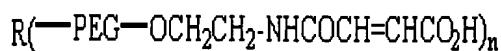


<27> (III)

<28> 상기 식에서 R은 중앙 핵(central core)이고;

<29> n은 암의 개수로서 3 내지 12인 정수임.

<30> 【화학식 6】



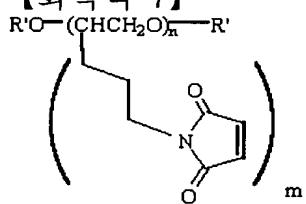
<31> (III-a)

<32> 상기 식에서 R은 중앙 핵이고;

<33> n은 암의 개수로서 3 내지 12인 정수임.

<34> 또한 본 발명은 일반식 (IV)의 펜던트 형 다중-암 PEG-말레이미드(Multi-arm PEG-maleimide) 중합체 화합물을 제조하는 방법에 있어서, 일반식 (IV-a)의 펜던트 형 다중-암 PEG-말레이미드 산에 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트와 같은 반응화제를 염기 및 유기용매 존재 하에 반응시킴으로서 시클릭화를 시켜 일반식 (IV) 중합체 화합물을 제조함을 특징으로 하는 제조방법을 제공한다.

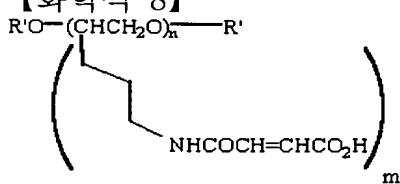
&lt;35&gt; 【화학식 7】



&lt;36&gt;

(IV)

&lt;37&gt; 【화학식 8】



&lt;38&gt;

(IV-a)

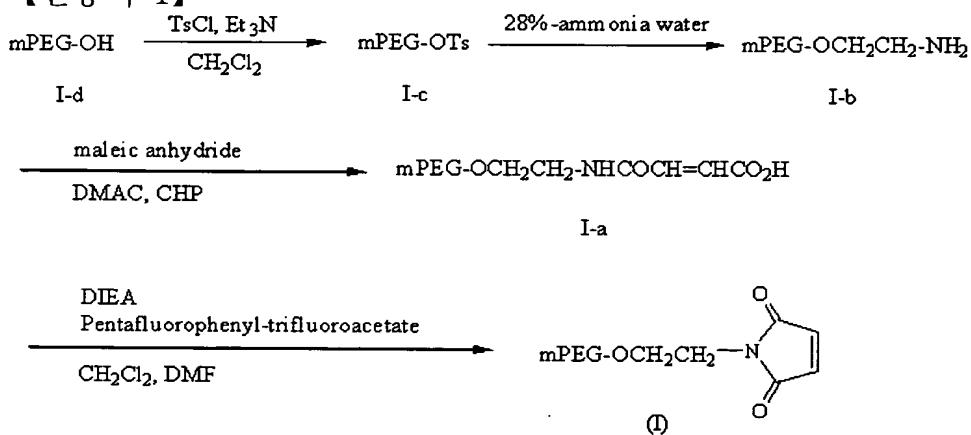
<39> 상기의 식에서, R'은 수소 또는 탄소수 1 내지 3의 저급알킬기를 나타내고, n'는 3 내지 12의 정수이고, m은 1 내지 20의 암의 개수를 나타낸다.

<40> 상기 일반식 (I) 내지 (IV) 중합체 화합물을 제조하는 반응에서 사용되는 염기는 DIEA(diisopropylethyl amine), DEA(Diethylenamine)등이 바람직하며, 유기용매는

1~4:1의 혼합비를 갖는 디클로로메탄 및 DMF의 혼합용매가 바람직하며, 50~60°C의 반응 온도에서 24시간 동안 반응시킴이 바람직하다.

- <41> 이하 본 발명의 제조방법을 구체적으로 기재한다.
- <42> 본 발명의 보다 구체적으로 설명하기 위하여, 예를 들어, 하기의 반응식 1 내지 4에 도시된 방법에 의하여 생체적합성 고분자인 일반식 (I) 내지 (IV) PEG-말레이미드 중 합체 화합물을 제조할 수 있으며, 하기 반응식들은 본 발명을 설명하기 위해 도시한 것 이지, 본 발명의 범위를 제한하거나 한정하고자 함이 아니다.
- <43> 예를 들어, 본 발명의 일반식 (I)의 mPEG-말레이미드는 하기 반응식 1에 기재된 바와 같은 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

<44> 【반응식 1】

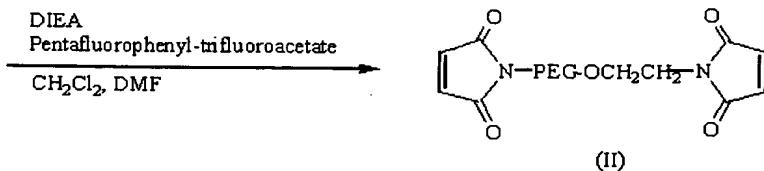
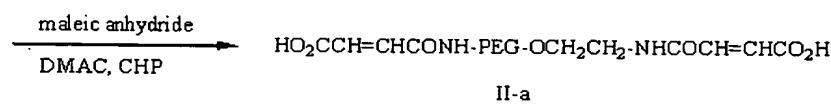
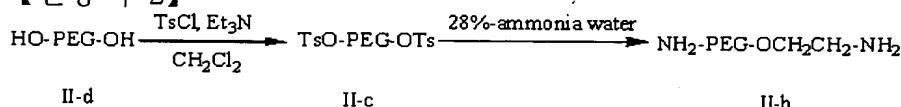


- <45> 상기의 반응식에 기재된 바와 같이, 본 발명은 mPEG-OH(I-d)에 반응화제로 염화 툴루엔솔폰산(*p*-tolunesulfonyl chloride)을 넣고 TEA(triet hylamine)과 같은 염기촉매 하에서 디클로로메탄을 유기용매로 사용하여 mPEG-토실레이트체 (I-c)를 제조하는 1단계

, 이 합성된 화합물 (I-c) 를 20 내지 30%의 암모니아수, 바람직하게는 28 %의 암모니아수 하에서 반응하여 아민체 화합물 (I-b)을 합성하는 제 2단계, 이 합성된 화합물 (I-b)에 반응화제로 말레산 무수물(maleic anhydride)을 사용하고 유기용매로 N,N-디메틸아세트아미드(DMAC, N,N-dimethylacetamide), N-사이클로헥실피롤리디논(CHP, N-cyclohexylpyrrolidinone)의 혼합용매, 바람직하게는 약 5:1의 혼합비를 갖는 혼합용매 하에 반응시켜 말레아믹 산 화합물 (I-a)를 얻는 제 3단계, 이 합성된 화합물 (I-a)에 반응화제로서 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 등과 같은 반응화제를 첨가하고 디클로로메탄 또는 DEA와 같은 염기 촉매 하에서, DIEA와 DMF의 혼합용매, 바람직하게는 4:1의 혼합비를 갖는 혼합용매를 사용하여 본 발명의 mPEG-말레이미드 유도체 (I)를 얻는 제 4단계의 합성방법을 포함하는 제조방법을 제공한다.

<46> 본 발명의 일반식 (II)의 PEG-비스(말레이미드) 화합물은 하기 반응식 2에 기재된 바와 같은 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

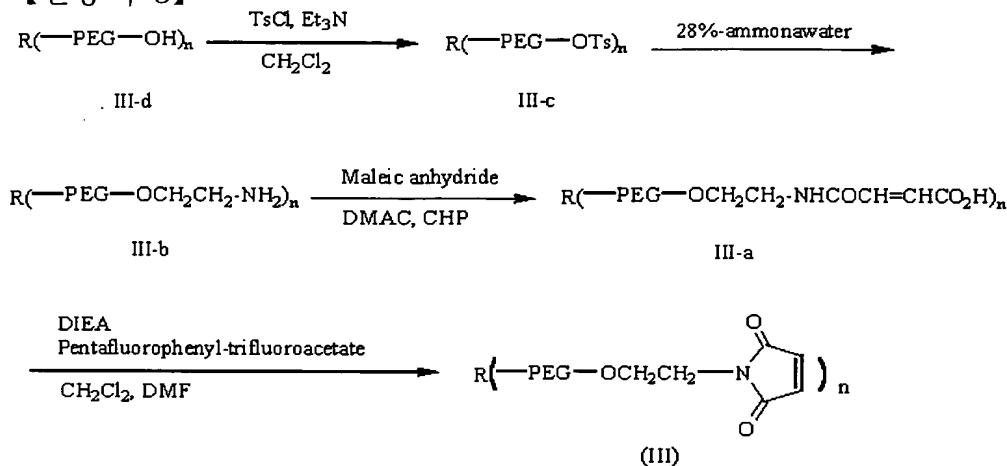
<47> 【반응식 2】



<48> 상기의 반응식에 기재된 바와 같이, 본 발명은 HO-PEG-OH(II-d)에 반응화제로 염화톨루엔су폰산과 같은 토실화제를 넣고 염기촉매 하에서 디클로로메탄 유기용매하에 반응시켜 토실 화합물 (II-c)을 제조하는 제 1단계, 이 합성된 화합물 (II-c)을 약 20 내지 30%, 바람직하게는 약 28 %의 암모니아수 하에서 반응하여 아민 화합물 (II-b)을 합성하는 제 2단계, 이 합성된 화합물 (II-b)에 반응화제로 말레산 무수물을 사용하고 유기용매로 DMAC(N,N-디메틸아세트아미드, N,N-dimethylacetamide)와 CHP(N-사이클로헥실페롤리디논, N-cyclohexylpyrrolidinone)의 혼합용매, 바람직하게는 약 5:1의 혼합비를 갖는 혼합용매하에 반응시켜 말레아믹 산 화합물(II-a)을 제조하는 제 3단계, 이 합성된 화합물 (II-a)에 반응화제로서 웬타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 등과 같은 반응화제를 첨가하고 DIEA 또는 DEA와 같은 염기 촉매 하에서, 디클로로메탄과 DMF의 혼합용매, 바람직하게는 4:1의 혼합비를 갖는 혼합용매를 사용하여 본 발명의 PEG-(말레이미드)<sub>2</sub> 유도체(II)를 얻는 제 4단계의 합성방법을 포함하는 제조방법을 제공한다.

<49> 본 발명의 일반식 (III)의 멀티 앰 PEG-말레이미드(Multi-arm PEG-maleimide) 종합체 화합물은 하기 반응식 3에 기재된 바와 같은 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

&lt;50&gt; 【반응식 3】



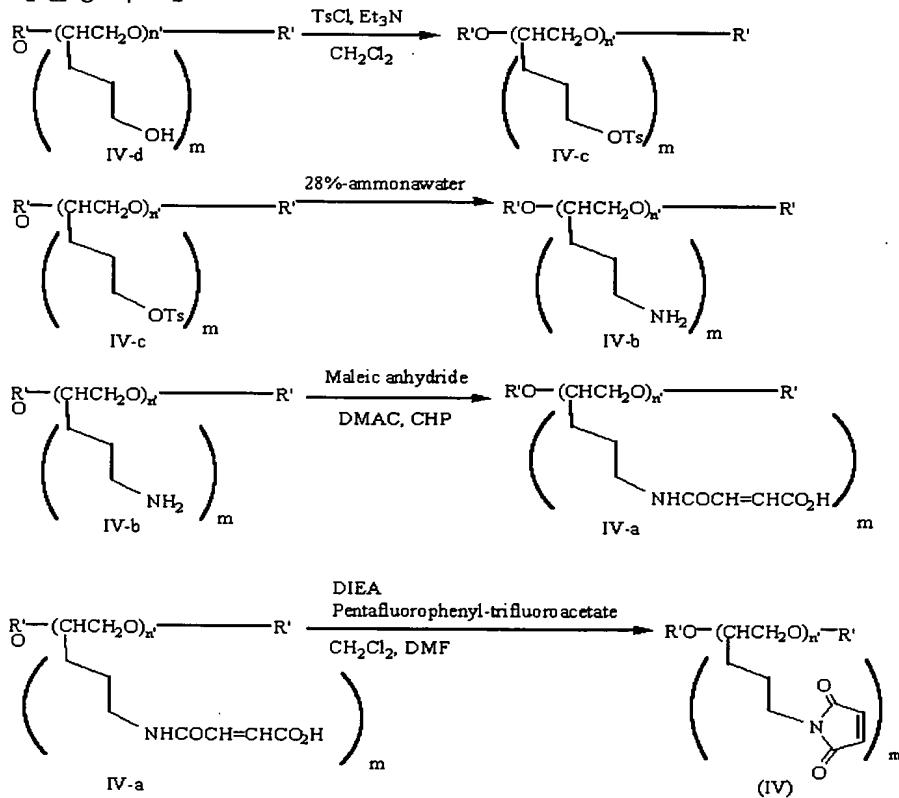
<51> 상기의 반응식에서, R은 멀티 암 PEG의 코아(core)이고, n은 PEG를 기본 골격으로 하는 암의 개수로서 3 내지 12개의 정수이며, 특히 가지가 4개인 4-암 PEG(4-arm PEG), 6개인 6-암 PEG이라 하며 12개의 가지를 가진 12-암 PEG 중합체 화합물을 등이 포함된다.

<52> 상기의 반응식에 기재된 바와 같이, 본 발명은 멀티-암 PEG (III-d)에 반응화제로 염화 틀루엔솔폰산과 같은 토실화제를 넣고 염기촉매 하에서 디클로로메탄 유기용매하에 반응시켜 토실 화합물 (III-c)을 제조하는 제 1단계, 이 합성된 화합물 (III-c)을 약 20 내지 30%, 바람직하게는 약 28%의 암모니아수 하에서 반응하여 아민 화합물 (III-b)을 합성하는 제 2단계, 이 합성된 화합물 (III-b)에 반응화제로 말레산 무수물을 사용하고 유기용매로 DMAc와 CHP의 혼합용매, 바람직하게는 약 5:1의 혼합비를 갖는 혼합용매하에 반응시켜 말레아믹 산 화합물(III-a)을 제조하는 제3단계, 이 합성된 화합물 (III-a)에 반응화제로서 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 등과 같은 반응화제를 첨가하고 디이소프로필에틸 아민 또는 DEA와 같은 염기 촉매 하에서, 디클로로메탄과 DMF의 혼합 용매, 바람직하게는 4:1의 혼합비를 갖는 혼합용매를 사용하여 본 발명의 멀티-암 PEG-

말레이미드 유도체 (III)를 얻는 제 4단계의 합성방법을 포함하는 제조방법을 제공한다.

<53> 본 발명의 일반식 (IV)의 펜던트 형 PEG-말레이미드(Pendant PEG - maleimide) 중 합체 화합물은 반응식 4에 기재된 바와 같은 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

<54> 【반응식 4】



<55> 상기의 반응식에서, 출발 물질 (IV-d)은 펜던트 형 PEG로서 기본 중합 단위인 PEG 기본골격(backbone)에 다수의 프로필(propyl) 가지가 붙어 있는 펜던트 형태의 PEG이다.  $\text{R}'$ 은 수소원자 또는 저급알킬기이고,  $n'$ 은 3 내지 12개의 정수이며,  $m$ 은 프로필 가지의

개수에 따라 결정되는 정수로써 1 내지 20개의 정수를 의미한다. 예를 들어 가지가 10개인 것을 10-암 펜던트 PEG 이라 한다.

<56> 상기 반응식과 같이, 본 발명은 펜던트-암 PEG (IV-d)에 반응화제로 염화 틀루엔솔 폰산과 같은 토실화제를 넣고 염기촉매 하에서 디클로로메탄 유기용매하에 반응시켜 토실 화합물 (IV-c)을 제조하는 제 1단계, 이 합성된 화합물 (IV-c)을 약 20 내지 30 %, 바람직하게는 약 28 %의 암모니아수 하에서 반응하여 아민 화합물 (IV-b)을 합성하는 제 2단계, 이 합성된 화합물 (IV-b)에 반응화제로 말레산 무수물을 사용하고 유기용매로 DMAc와 CHP의 혼합용매, 바람직하게는 약 5:1의 혼합비를 갖는 혼합용매하에 반응시켜 말레아믹 산 화합물(IV-a)을 제조하는 제 3단계, 이 합성된 화합물 (IV-a)에 반응화제로서 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 등과 같은 반응화제를 첨가하고 디이소프로필에틸 아민 또는 DEA와 같은 염기 촉매 하에서, 디클로로메탄과 DMF의 혼합용매, 바람직하게는 4:1의 혼합비를 갖는 혼합용매를 사용하여 본 발명의 펜던트 형 다중-암 PEG-말레이미드 유도체(IV)를 얻는 제 4단계의 합성방법을 포함하는 제조방법을 제공한다.

<57> 상기한 본 발명의 제조방법으로 제조될 수 있는 중합체는 에틸렌 글리콜을 기본으로 하는 선형(linear) mPEG, 선형 다기능(bifunctional) PEG 등의 선형 PEG, mPEG, 다중-암 PEG, 펜던트 형-다중-암-PEG 수용성 고분자를 포함한 가능한 모든 PEG 기본형 중합체들을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 그 분자량이 100 내지 1,000,000, 좀더 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 달톤(D) 인 PEG 중합체를 포함한다.

<58> 본 발명의 화합물은 생분해성 중합체가 유용한 임의의 용도, 예컨대 단백질 중 시스테인 부분의 선택적 결합, 다당류의 특정 도메인에의 선택적 결합, 항체와의 결합, 기

타 설프 하이드릴기를 포함하는 화합물과의 결합 등에 유용하게 사용할 수 있으며, 이들은 또한 소수성 및 친수성 공중합체로서의 특성을 갖는 특정 이점을 제공할 수 있는 용도로서 사용될 수 있다.

<59> 본 발명은 다음의 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 하기 실시예에 의해 제한되지는 않는다.

<60> 실시예 1. mPEG-말레이미드 20 K의 제조 방법

<61> 1-1. mPEG-토실레이트 20 K (mPEG-tosylate 20 K)의 제조

<62> mPEG-OH 60 g (분자량 20000, 3 mmol)을 디클로로메탄 300 ml에 녹인 후, 2.5 ml의 트리에틸아민(TEA, 18 mmol)을 첨가하고, 약 10분 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 p-톨루엔설포닐클로라이드(TsCl) 2.9 g (15 mmol, 5 당량)를 디클로로메탄에 녹여 첨가한 후, 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 용액을 여과하여 염을 제거하였고, 여액을 포화 염화암모늄(NH<sub>4</sub>Cl) 용액으로 두 번 세척하였으며, 유기층을 황산마그네슘(MgSO<sub>4</sub>)으로 건조한 후 여과하여 건조제를 제거하였다. 용매를 증류하여 제거한 후, 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전 화합물을 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, mPEG-토실레이트 58 g을 얻었다.

<63> <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 2.45 ppm (s, 3H, -CCH<sub>3</sub>), 3.36 ppm (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.64 ppm (s, 1818H, PEG backbone, -OCH<sub>2</sub>-), 4.24 ppm (t, 2H, -CH<sub>2</sub>OTs), 7.35-7.79 ppm (d, 4H, aromatic ring)

<64> 1-2. mPEG-아민 20 K(mPEG-NH<sub>2</sub> 20 K)의 제조

<65> mPEG-토실레이트 화합물 58g(분자량 20155, 2.88 mmol)을 암모니아수 400 ml에 넣고 실온에서 10일 동안 반응하였으며, 반응 혼합물을 디클로로메탄으로 두 번 추출하고, 추출물을 황산마그네슘(MgSO<sub>4</sub>)으로 건조한 후 여과하여 건조제를 제거하였다. 용매를 증류하여 제거한 후 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, mPEG-아민 55 g을 얻었다.

<66> <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 2.87 ppm (t, 2H, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.36 ppm (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.64 ppm (s, 1818H, PEG backbone, -OCH<sub>2</sub>-)

<67> 1-3. mPEG-말레아믹 산 20 K의 제조

<68> mPEG-아민 55g(분자량 20000, 2.75 mmol)을 DMAc 220 ml 와 CHP 55ml에 녹인 후 말레산 무수를 2.7 g(27.5 mmol, 10당량)를 넣었다. 딘스탁 트랩 장치(Dean-stark trap set)를 설치하고 공동용매(co-solvent)를 툴루엔으로 사용하여 80 °C에서 16시간동안 교반하였다. 반응온도를 실온으로 낮추고 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, mPEG-말레아믹 산 화합물 52 g을 얻었다.

<69> <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 3.36 ppm (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.64 ppm (s, 1818H, PEG backbone, -OCH<sub>2</sub>-), 6.28 ppm 6.15 ppm (d, 2H, -O<sub>2</sub>CCHCHCO<sub>2</sub>H)

<70> 1-4. mPEG-말레이미드 20 K의 제조

<71> mPEG-말레이릭 산 52 g (분자량 20100, 2.59 mmol)을 디클로로메탄 156 mL와 DMF 39 mL에 녹이고 0 °C에서 DIEA 1.1 mL(6.48 mmol, 2.5 당량)와 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 1.1 mL(6.48 mmol, 2.5 당량)을 넣어 주고 55 °C에서 24시간동안 교반하였다. 용매를 증류하여 제거한 후 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물을 감압 여과하였다. 여과물을 디클로로메탄 1 L에 녹이고, 활성탄(activated carbon) 20 g을 넣고 5시간 동안 교반하였다. 혼합물을 셀라이트 패드(celite pad)에 여과하여 활성탄을 제거하고 용매를 증류하여 제거한다. 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, mPEG-말레이미드 20 K 화합물 30 g을 얻었다.

<72>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 3.36 ppm (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.64 ppm (s, 1818H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2-$ ), 6.70 ppm (s, 2H,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ )

### <73> 실시예 2. PEG-비스(말레이미드) 10 K의 제조 방법

#### <74> 2-1. PEG-비스(토실레이트) 10 K( $(\text{PEG-}( \text{tosylate})_2$ ) 10 K)의 제조

<75> PEG-(OH)<sub>2</sub> 50 g (분자량 10000, 5 mmol)을 디클로로메탄 250 mL에 녹인 후, 8.4 mL의 TEA (60 mmol, 12 당량)을 첨가하고 약 10분 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 *p*-톨루엔설포닐클로라이드 (TsCl) 9.5 g (50 mmol, 10 당량)를 디클로로메탄에 녹여 첨가한 후, 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 용액을 여과하여 염을 제거하였고, 여액을 포화 염화암모늄( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 용액으로 두 번 세척하였으며, 유기층을 황산마그네슘( $\text{MgSO}_4$ )으로 건조한 후 여과하여 건조제를 제거하였다. 용매를 증류하여 제거한 후, 디에틸에테르

를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전 화합물을 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, PEG-비스(토실레이트) 10 K 화합물 49 g을 얻었다.

<76>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 2.45 ppm (s, 6H,  $-\text{CCH}_3$ ), 3.64 ppm (s, 909H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2-$ ), 4.24 ppm (t, 4H,  $-\text{CH}_2\text{OTs}$ ), 7.35–7.79 ppm (d, 8H, aromatic ring)

<77> 2-2. PEG-비스(아민) 10 K( $\text{PEG-(NH}_2)_2$  10 K)의 제조

<78> 두 기능의(Bifunctional) PEG-비스(토실레이트) 화합물 49 g(분자량 10310, 4.75 mmol)을 암모니아수 300 ml에 넣고 실온에서 10일 동안 반응하였으며, 반응 혼합물을 디클로로메탄으로 두 번 추출하고, 추출물을 황산마그네슘( $\text{MgSO}_4$ )으로 건조한 후 여과하여 건조제를 제거하였다. 용매를 증류하여 제거한 후 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, PEG-비스(아민) 화합물 47 g을 얻었다.

<79>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 2.87 ppm (t, 4H,  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.64 ppm (s, 909H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2-$ )

<80> 2-3. PEG-비스(말레아믹 산) 20 K ( $\text{PEG-(maleamic acid)}_2$ )의 제조

<81> PEG-비스(아민) ( $\text{PEG-(NH}_2)_2$ ) 47 g(분자량 10000, 4.7 mmol)을 DMAC 188 ml 와 CHP 47 ml에 녹인 후 말레산 무수물 9.2 g(94 mmol, 20 당량)를 넣었다. 딘스

탁 트랩 장치를 설치하고 공동용매를 툴루엔으로 사용하여 80 °C에서 16시간동안 교반하였다. 반응온도를 실온으로 낮추고 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, PEG-비스(말레아믹산) 10 K(PEG-(말레아믹 산)<sub>2</sub>) 중합체 화합물 44 g을 얻었다.

<82>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 3.64 ppm (s, 909H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2-$ ), 6.28 ppm 6.15 ppm (d, 4H,  $-\text{O}_2\text{CCHCHCO}_2\text{H}$ )

<83> 2-4. PEG-비스(말레이미드) 10 K(PEG-(maleimide)<sub>2</sub>)의 제조

<84> PEG-비스(말레아믹 산) 44 g (분자량 10200, 4.31 mmol)을 디클로로메탄 132 mL와 DMF 33 mL에 녹이고 0 °C에서 DIEA 3.8 mL(21.6 mmol, 5 당량)와 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 3.7 mL(21.6 mmol, 5 당량)을 넣어 주고 55 °C에서 24시간동안 교반하였다. 용매를 증류하여 제거한 후 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물을 감압 여과하였다. 여과물을 디클로로메탄 800 mL에 녹이고, 활성탄 16 g을 넣고 5시간 동안 교반하였다. 혼합물을 셀라이트 패드에 여과하여 활성탄을 제거하고 용매를 증류하여 제거한다. 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, PEG-(말레이미드)<sub>2</sub> 10 K 20 g을 얻었다.

<85>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 3.64 ppm (s, 909H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2-$ ), 6.70 ppm (s, 4H,  $-\text{CH=CH-}$ )

<86> 실시예 3. 멀티-암 PEG-말레이미드(Multi-arm PEG-maleimide) 제조 방법

<87> 3-1. 멀티-암 PEG 말레이미드(4-arm PEG-maleimide) 10 K의 제조 방법

<88> 3-1-1. 4-암 PEG-토실레이트(4-arm PEG-tosylate) 10 K의 제조

<89> 4-암 PEG-OH 20 g (분자량 10000, 2 mmol)을 디클로로메탄 100 mL에 녹인 후, TEA 6.7 mL (48 mmol, 24 당량)을 첨가하고 약 10분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 p-톨루엔설포닐클로라이드 (TsCl) 7.6 g (40 mmol, 20 당량)를 디클로로메탄에 녹여 첨가한 후, 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 용액을 여과하여 염을 제거하였고, 여액을 포화 염화암모늄(NH<sub>4</sub>Cl) 용액으로 두 번 세척하였으며, 유기층을 황산마그네슘(MgSO<sub>4</sub>)으로 건조한 후 여과하여 건조제를 제거하였다. 용매를 증류하여 제거한 후, 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전 화합물을 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, 4-암 PEG-토실레이트 10 K 화합물 19 g을 얻었다.

<90> <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 2.45 ppm (s, 12H, -CCH<sub>3</sub>), 3.41 ppm (s, 8H, -CCH<sub>2</sub>O-), 3.64 ppm (s, 909H, PEG backbone, -OCH<sub>2</sub>-), 4.24 ppm (t, 8H, -CH<sub>2</sub>OTs), 7.35-7.79 ppm (d, 16H, aromatic ring)

<91> 3-1-2. 4-암 PEG-아민 10 K (4-arm PEG-NH<sub>2</sub>) 10 K 의 제조

<92> 4-암 PEG-토실레이트 중합체 화합물 19 g (분자량 10620, 1.79 mmol)을 암모니아수 200 mL에 넣고 실온에서 10일 동안 반응하였으며, 반응 혼합물을 디클로로메탄으로 두 번 추출하고, 추출물을 황산마그네슘(MgSO<sub>4</sub>)으로 건조한 후 여과하여 건조제를 제거하였다. 용매를 증류하여 제거한 후 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화

합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, 4-암 PEG-아민 10 K 중합체 화합물 17 g을 얻었다.

<93>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 2.87 ppm (t, 8H,  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.41 ppm (s, 8H,  $-\text{CCH}_2\text{O}-$ ), 3.64 ppm (s, 909H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2-$ )

#### <94> 3-1-3. 4-암 PEG-말레아믹 산 10 K의 제조

<95> 4-암 PEG-아민 17 g(분자량 10000, 1.7 mmol)을 DMAC 68 ml 와 CHP 17 ml에 녹인 후 말레산 무수물 6.7 g(68 mmol, 40당량)를 넣었다. 딘스탁트랩 장치를 설치하고 공동용매를 툴루엔으로 사용하여 80 °C에서 16시간동안 교반하였다. 반응온도를 실온으로 낮추고 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간동안 건조하여, 4-암 PEG-말레아믹 산 10 K 중합체 화합물 15 g을 얻었다.

<96>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 3.41 ppm (s, 8H,  $-\text{CCH}_2\text{O}-$ ), 3.64 ppm (s, 909H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2-$ ), 6.28 ppm 6.15 ppm (d, 8H,  $-\text{O}_2\text{CCHCHCO}_2\text{H}$ )

#### <97> 3-1-4. 4-암 PEG-말레이미드 10 K의 제조

<98> 4-암 PEG-말레아믹 산 15 g (분자량 10400, 1.44 mmol)을 디클로로메탄 45 ml와 DMF 11 ml에 녹이고 0°C에서 DIEA 2.5 ml(14.4 mmol, 10 당량)와 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 2.5 ml(14.4 mmol, 10 당량)을 넣어 주고 55 °C에서 24시간동안 교

반하였다. 용매를 증류하여 제거한 후 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물을 감압 여과하였다. 여과물을 디클로로메탄 300 ml에 녹이고, 활성탄 6 g을 넣고 5시간 동안 교반하였다. 혼합물을 셀라이트 패드에 여과하여 활성탄을 제거하고 용매를 증류하여 제거한다. 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, 4-암 PEG-말레이미드 10 K 종합체 화합물 9 g을 얻었다

<99>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 3.41 ppm (s, 8H,  $-\text{CCH}_2\text{O}-$ ), 3.64 ppm (s, 909H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2-$ ), 6.70 ppm (s, 8H,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ )

### <100> 3-2. 6-암 PEG-말레이미드 20 K의 제조 방법

#### <101> 3-2-1. 6-암 PEG-토실레이트 20 K의 제조

<102> 6-암 PEG-OH 40 g (분자량 20000, 2 mmol)을 디클로로메탄 200 ml에 녹인 후, TEA 10 ml (72 mmol, 36 당량)을 첨가하고 약 10분 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 p-톨루엔설포닐클로라이드 (TsCl) 11.4 g (60 mmol, 30 당량)를 디클로로메탄에 녹여 첨가한 후, 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 용액을 여과하여 염을 제거하였고, 여액을 포화 염화암모늄( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 용액으로 두 번 세척하였으며, 유기층을 황산마그네슘( $\text{MgSO}_4$ )으로 건조한 후 여과하여 건조제를 제거하였다. 용매를 증류하여 제거한 후, 디에틸에테르

를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전 화합물을 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, 6-암 PEG-토실레이트 20 K 중합체 화합물 38 g을 얻었다.

<103>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 2.45 ppm (s, 18H,  $-\text{CCH}_3$ ), 3.64 ppm (s, 1818H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2-$ ), 4.24 ppm (t, 12H,  $-\text{CH}_2\text{OTs}$ ), 7.35-7.79 ppm (d, 24H, aromatic ring)

<104> 3-2-2. 6-암 PEG-아민 20 K (6-arm PEG-NH<sub>2</sub>) 10 K 의 제조

<105> 6-암 PEG-토실레이트 중합체 화합물 38 g (분자량 20930, 3.48 mmol)을 암모니아수 300 ml에 넣고 실온에서 10일 동안 반응하였으며, 반응 혼합물을 디클로로메탄으로 두 번 추출하고, 추출물을 황산마그네슘( $\text{MgSO}_4$ )으로 건조한 후 여과하여 건조제를 제거하였다. 용매를 증류하여 제거한 후 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, 6-암 PEG-아민 10 K 중합체 화합물 35 g을 얻었다.

<106>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 2.87 ppm (t, 12H,  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.64 ppm (s, 1818H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2$ )

<107> 3-2-3. 6-암 PEG-말레아믹 산 20 K의 제조

<108> 6-암 PEG-아민 35 g (분자량 20000, 1.75 mmol)을 DMAC 140 ml와 CHP 35 ml에 녹인 후 말레산 무수를 10.3 g (105 mmol, 60 당량)를 넣었다. 딘스탁 트랩 장치를 설치하고 공동용매를 톨루엔으로 사용하여 80 °C에서 16시간동안 교반하였다. 반응온도를 실

온으로 낮추고 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물을은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, 6-암 PEG-말레이아믹 산 20 K 중합체 화합물 32 g을 얻었다.

<109>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 3.64 ppm (s, 1818H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2-$ ), 6.28 ppm 6.15 ppm (d, 12H,  $-\text{O}_2\text{CCHCHCO}_2\text{H}$ )

<110> 3-2-4. 6-암 PEG-말레이미드 20 K의 제조

<111> 6-암 PEG-말레이아믹 산 32 g (분자량 20600, 1.55 mmol)을 디클로로메탄 96 mL와 DMF 24 mL에 녹이고 0°C에서 DIEA 4.1 mL (23.3 mmol, 15 당량)와 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 4.1 mL(23.3 mmol, 15 당량)을 넣어 주고 55 °C에서 24시간동안 교반하였다. 용매를 증류하여 제거한 후 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물을은 감압 여과하였다. 여과물을 디클로로메탄 600 mL에 녹이고, 활성탄 12 g을 넣고 5시간 동안 교반하였다. 혼합물을 셀라이트 패드에 여과하여 활성탄을 제거하고 용매를 증류하여 제거한다. 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물을은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, 6-암 PEG-말레이미드 20 K 중합체 화합물 18 g을 얻었다.

<112>  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 3.64 ppm (s, 1818H, PEG backbone,  $-\text{OCH}_2-$ ), 6.70 ppm (s, 12H,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ )

<113> 실시예 4. 10-암 펜던트 PEG-말레이미드(10-arm pendant PEG-maleimide)의 제조 방법

<114> 4-1. 10-암 펜던트 PEG-토실레이트 20 K의 제조

<115> 10-암 펜던트 PEG-OH 20 g (분자량 20000, 1 mmol)을 디클로로메탄 100 ml에 녹인 후, TEA 8.4 ml (60 mmol, 60 당량)을 첨가하고 약 10분 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 p-톨루엔설포닐클로라이드 (TsCl) 9.5 g (50 mmol, 50 당량)를 디클로로메탄에 녹여 첨가한 후, 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 용액을 여과하여 염을 제거하였고, 여액을 포화 염화암모늄(NH<sub>4</sub>Cl) 용액으로 두 번 세척하였으며, 유기층을 황산마그네슘 (MgSO<sub>4</sub>)으로 건조한 후 여과하여 건조제를 제거하였다. 용매를 증류하여 제거한 후, 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전 화합물을 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여 10-암 펜던트 PEG-토실레이트 20 K 중합체 화합물 18 g을 얻었다.

<116> 4-2. 10-암 펜던트 PEG-아민 20 K (10-arm pendant PEG-NH<sub>2</sub>) 의 제조

<117> 10-암 펜던트 PEG-토실레이트 중합체 화합물 18 g (분자량 21550, 0.84 mmol)을 암모니아수 200 ml에 넣고 실온에서 10일 동안 반응하였으며, 반응 혼합물을 디클로로메탄으로 두 번 추출하고, 추출물을 황산마그네슘(MgSO<sub>4</sub>)으로 건조한 후 여과하여 건조제를 제거하였다. 용매를 증류하여 제거한 후 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전중합체 화합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, 10-암 펜던트 PEG-아민 20 K 중합체 화합물 16 g을 얻었다.

<118> 4-3. 10-암 펜던트 PEG-말레아믹 산 20 K의 제조

<119> 10-암 펜던트 PEG-아민 16 g (분자량 20000, 0.8 mmol)을 DMAC 64 ml 와 CHP 16 ml에 녹인 후 말레산 무수물 7.9 g (80 mmol, 100 당량)를 넣었다. 딘스탁 트랩 장치를 설치하고 공동용매를 톨루엔으로 사용하여 80 °C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응온도를 실온으로 낮추고 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물을 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여, 10-암 펜던트 PEG-말레아믹 산 20K 중합체 화합물 15 g을 얻었다.

<120> 4-4. 10-암 펜던트 PEG-말레이미드 20 K의 제조

<121> 10-암 펜던트 PEG-말레아믹 산 15 g (분자량 21000, 0.71 mmol)을 디클로로메탄 45 ml와 DMF 11ml에 녹이고 0°C에서 DIEA 3.1 ml (17.8 mmol, 25 당량)와 펜타플루오로페닐트리플루오로아세테이트 3.1 ml(17.8 mmol, 25 당량)을 넣어 주고 55 °C에서 24시간 동안 교반하였다. 용매를 증류하여 제거한 후 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물을 감압 여과하였다. 여과물을 디클로로메탄 300 ml에 녹이고, 활성탄 6 g을 넣고 5시간 동안 교반하였다. 혼합물을 셀라이트 패드에 여과하여 활성탄을 제거하고 용매를 증류하여 제거한다. 디에틸에테르를 첨가하여 침전을 유도하였으며, 침전화합물은 감압 여과한 후 진공 감압 하에서 12시간 동안 건조하여 10-암 펜던트 PEG-말레이미드 20 K 중합체 화합물 9 g을 얻었다.

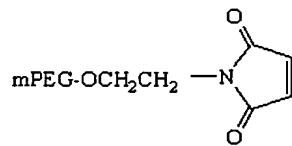
**【발명의 효과】**

<122> 이상에서 살펴본 본 바와 같이, 본 발명에 따라 다당류, 단백질, 항체 등의 생명공학 제품이나 화학의약품 등의 특정 부위나 도메인에 선택적으로 결합할 수 있는 PEG-말레이미드 유도체를 새로운 방법으로 합성하고 고수율, 고순도의 제품을 생산하는 것이다.

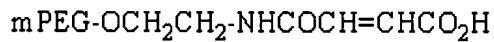
**【특허청구범위】**

**【청구항 1】**

하기 일반식 (I)의 mPEG-말레이미드 중합체 화합물을 제조하는 방법에 있어서, 하기 일반식 (I-a)의 mPEG-말레이아믹 산 유도체에 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트와 같은 반응화제를 염기 및 유기용매 존재 하에 반응시킴으로서 시클릭화를 시켜 일반식 (I) 중합체 화합물을 제조함을 특징으로 하는 제조방법;



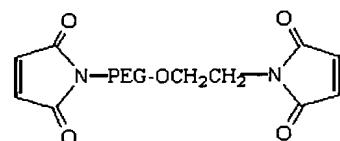
( I )



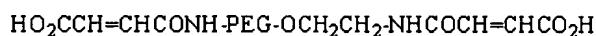
( I-a )

**【청구항 2】**

하기 일반식 (II)의 PEG-(말레이미드)<sub>2</sub> 중합체 화합물을 제조하는 방법에 있어서, 일반식 (II-a)의 PEG-비스(말레이아믹 산)<sub>2</sub>에 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트와 같은 반응화제를 염기 및 유기용매 존재 하에 반응시킴으로서 시클릭화를 시켜 일반식 (II) 중합체 화합물을 제조함을 특징으로 하는 제조방법;



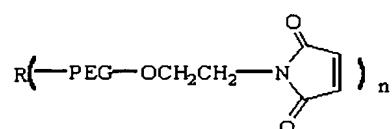
(II)



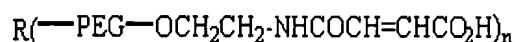
(II-a)

## 【청구항 3】

하기 일반식 (III)의 다중 암 PEG-말레이미드 중합체 화합물을 제조하는 방법에 있어서, 일반식 (III-a)의 다중 암 PEG-말레아믹산에 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트와 같은 반응화제를 염기 및 유기용매 존재 하에 반응시킴으로서 시클릭화를 시켜 일반식 (III) 중합체 화합물을 제조함을 특징으로 하는 제조방법;



(III)



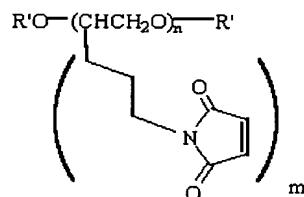
(III-a)

상기 식에서 R은 중앙 핵이고;

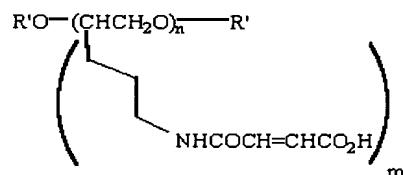
$n$ 은 암의 개수로서 3 내지 12인 정수임.

#### 【청구항 4】

하기 일반식 (IV)의 다중 암 펜던트 PEG-말레이미드 중합체 화합물을 제조하는 방법에 있어서, 일반식 (IV-a)의 다중 암 펜던트 PEG-말레이아믹 산에 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트와 같은 반응화제를 염기 및 유기용매 존재 하에 반응시킴으로서 시클릭화를 시켜 일반식 (IV) 중합체 화합물을 제조함을 특징으로 하는 제조방법;



(IV)



(IV-a)

상기의 식에서,

$\text{R}'$  은 수소 또는 탄소수 1 내지 3의 저급알킬기를 나타내고,

$n'$ 는 3 내지 12의 정수이고,



1020030028807

출력 일자: 2003/7/9

m은 1 내지 20의 암의 개수를 나타낸다.

#### 【청구항 5】

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 반응화제는 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트임을 특징으로 하는 제조방법.

#### 【청구항 6】

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 염기는 DIEA 또는 DEA인 것임을 특징으로 하는 제조방법.

#### 【청구항 7】

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 유기용매는 디클로로메탄 과 DMF의 혼합 용매를 사용함을 특징으로 하는 제조방법.

#### 【청구항 8】

제 7항에 있어서, 유기용매는 디클로로메탄 및 DMF(4:1) 혼합용매를 사용함을 특징으로 하는 제조방법.



1020030028807

출력 일자: 2003/7/9

【청구항 9】

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 일반식 (I) 내지 (IV)의 PEG 중합체는 에틸렌 글리콜을 기본으로 하는 선형 mPEG, 선형 다기능 PEG 등의 선형 PEG, mPEG, 다중-암 PEG, 펜던트 형-다중-암-PEG 수용성 고분자를 포함한 PEG 기본형 중합체인 제조방법.

【청구항 10】

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 일반식 (I) 내지 (IV)의 PEG 중합체는 분자량이 100 내지 1,000,000 달톤(D)인 PEG 중합체 제조방법.